动 物 学 研 究 2009，Jun. 30(3): 262−266 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.03262

绵羊*tnp2*基因的克隆及其在体外共培养系统中圆形精子细胞的转录分析

白音巴图，罗奋华，胡甜园，侯 越，吴应积*

（内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室，内蒙古 呼和浩特 010021）

摘要：过渡蛋白2基因（*tnp2*）是圆形精子细胞特异表达的基因。为了开展绵羊圆形精子细胞标记基因的研究，根据GenBank上已公布的牛的cDNA序列设计引物，采用RT-PCR和分子克隆方法，克隆了蒙古绵羊*tnp2*基因cDNA部分编码区序列。DNA 序列测定结果与牛的核苷酸序列比对，同源性为95.3%。根据绵羊*tnp2*基因的cDNA序列设计引物，对共培养的四月龄绵羊睾丸生殖细胞进行RT-PCR鉴定。结果显示体外共培养的绵羊睾丸生殖细胞一直到第十周后仍有圆形精子细胞产生。绵羊*tnp2*基因的cDNA克隆和序列测定为进一步研究绵羊精子发生过程奠定了基础。

关键词：绵羊；*tnp2*基因；克隆；序列分析；圆形精子细胞
中图分类号：Q593.4；Q954.4；Q959.842 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)03-0262-05

Cloning of Sheep *tnp2* Gene and Transcription Analysis of Round Spermatid Cells in the *in vitro* Co-culture System

BAI Yin-ba-tu, LUO Fen-hua, HU Tian-yuan, HOU Yue, WU Ying-ji*

(*The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Inner Mongolia Hohhot* 010021, *China*)

Abstract: The transition protein-2 gene (*tnp2*) have been reported as the round spermatid-specific marker gene. However, the DNA sequence of *tnp2* gene in *Ovis aries* have not been reported. In order to study the sheep round spermatid-specific marker gene, we designed primers according to the reported *Bos taurus tnp2* gene cDNA sequences in the GenBank. The partial CDS was amplified by RT-PCR. The PCR fragment was inserted into the T-A cloning vector pMD19-T. The partial nucleotide sequences of Mongolia sheep *tnp2* gene were compared with the counterpart sequences of *Bos taurus*, and the nucleotide homology was 95.3%. Using the primers designed according to the *tnp2* cDNA sequence, the *tnp2* gene transcription expression in the co-cultured cells derived from four-months old sheep testis was assessed by RT-PCR. The results demonstrate that the round spermatid cells are generated in the co-culture system until ten weeks *in vitro*. The cDNA cloning and sequencing lay down a foundation for further study on spermatogenesis of sheep.

Key words: Sheep; *tnp2* gene; Cloning; Sequence analysis; Round spermatid

哺乳动物的精子发生是一个在曲细精管内非常复杂的生殖细胞发育过程。精子发生过程中，二倍体精原细胞通过有丝分裂分化成精母细胞，接着精母细胞通过减数分裂产生单倍体精子细胞，随后精子细胞进行形态分化产生精子(Parvinen，1982)。精子发生过程不仅仅受LH（luteinizing hormone）和FSH（follicle-stimulating hormone）等促性腺激素调控，同时也受精原细胞和体细胞相互作用的调控(Skinner，1991；Kierszenbaum，1994；Griswold，1995)，然而具体机制还不是十分清楚。近些年，生殖细胞体外培养技术的发展为精子发生过程的体外重演提供了可能，使研究者便于通过体外培养的

收稿日期：2009-02-06；接受日期：2009-05-11
基金项目：内蒙古自治区自然科学基金重大项目（2004080204）[Natural Science Foundation of Inner Mongolia Municipality in China(2004080204)]
*通讯作者(Corresponding author), 男，教授，博士生导师，E-mail:yingji_wu@yahoo.com
第一作者简介：白音巴图(1983-)，男，在读硕士，研究方向为哺乳动物生殖生物学及生物技术

方法来鉴别生殖细胞分化、减数分裂和精子发生过程中起作用的因子和基因等。

初级精母细胞分裂产生单倍体的圆形精子细胞，标志着精子变态过程的开始。精子变态经历了复杂的形态、生化和生理变化，这些变化都伴随着阶段特异性基因表达。圆形精子细胞和其后的分化形态的鉴定对这一过程的研究具有重要意义。但是至今为止还未见用于鉴定圆形精子细胞的抗体，使得体内外圆形精子细胞相关的研究缺乏可靠的依据。只从形态特征判定圆形精子细胞是不够精确的。过渡蛋白 2 基因 (transition protein-2 gene，*tnp2*)是在雄性生殖细胞减数分裂后期表达的一个基因，其 mRNA 最先在圆形精子细胞中合成并储存，直至在长型精子细胞中被激活指导翻译(Hecht，1990；Marret et al，1998)。因此，可通过检测 *tnp2* 基因的转录表达来判断雄性生殖细胞体外共培养体系中圆形精子细胞的存在。目前已成功克隆了人、牛、猪、黑猩猩、小鼠和大鼠的 *tnp2* 基因，但绵羊的 *tnp2* 基因尚未报道。为了进一步研究绵羊的精子发生过程，本研究克隆了绵羊 *tnp2* 基因的 cDNA 部分编码区，为圆形精子细胞特异表达基因的转录表达分析提供了条件。同时通过 RT-PCR 法对我们建立的绵羊雄性生殖细胞体外共培养体系中 *tnp2* 基因的转录表达进行分析，来检测该体系中是否有圆形精子细胞的形成，从分子水平上对体外培养的圆形精子细胞进行鉴定，以期为进一步研究绵羊体外精子发生过程打下基础。

1　材料与方法

1.1　试剂及耗材

pMD19-T载体、限制性内切酶和T4 DNA连接酶、M-MLV反转录酶、ExTaq DNA聚合酶和DNA Marker等均购自TakaRa公司，总RNA提取试剂盒(Cat.NO.DP419)购自北京天根公司，胶回收试剂盒(Cat.NO.28704)购自QIAGEN 公司，*E.coli* DH5α感受态细胞为本实验室保存。其它化学试剂为国产分析纯。

1.2　试验材料

成年蒙古绵羊睾丸取自于内蒙古穆斯林屠宰场，带回实验室后置于−80℃冰箱保存备用。

1.3　睾丸组织的总RNA的制备

从绵羊睾丸组织块分离总RNA。利用TIANGEN公司的总RNA提取试剂盒按照使用说明书的操作程序提取绵羊睾丸组织总RNA，用紫外分光光度仪测定RNA浓度后，置于−80℃冰箱保存备用。

1.4　RT-PCR扩增

利用M-MLV反转录酶并按照使用说明书的操作程序进行反转录反应，得到cDNA第一链。以得到的cDNA第一链为模板，利用计算机软件CLC Free Workbench 4 对已知的人、大鼠、小鼠、牛、猪和黑猩猩的*tnp2*基因的核苷酸序列进行同源比较，得出*tnp2* cDNA序列的保守区。根据保守区中牛的*tnp2*基因(GenBank accession number:NM_174200)的cDNA编码区序列，设计一对PCR引物。上游引物(P1)：5' CCTATGGACACCCAGACT-CAC 3'；下游引物(P2)：5' AGTTGTACTTCCGTC-CTGAGC 3'。PCR反应体系为10 μL，扩增条件为：94℃预变性4 min；94℃变性40 s，56℃退火40 s，72℃延伸40 s，共进行35个循环；72℃延伸10 min。Mg^{2+}浓度通过梯度测试法优化。PCR产物在1%的琼脂糖凝胶通过电泳分离，在0.01%的溴化乙锭（ethidium bromide，EB）溶液中染色，在紫外光激发下通过凝胶成像仪（Bio-Rad，P91）拍摄图片。

1.5　cDNA克隆载体的构建与鉴定

按照Mg^{2+}浓度优化后的条件扩大PCR反应，然后利用QIAGEN胶回收试剂盒回收目的片段cDNA。测定浓度后，按照T-A克隆载体pMD19-T的使用说明书将获得的cDNA目的片段连接到pMD19-T克隆载体上，获得重组DNA。将重组DNA转化*E.coli* DH5α感受态细胞，在含有X-gal、IPTG和氨苄青霉素的LB平板培养基中37℃培养14 h后进行蓝白斑筛选。选择白色菌落，用质粒提取试剂盒提取质粒，PCR法筛选阳性质粒，限制性内切酶*Hin*dIII和*Bam*H1双酶切鉴定重组质粒。将鉴定阳性的重组质粒送至上海生工生物工程有限责任公司进行测序。

1.6　生物信息学方法

*tnp2*基因cDNA序列用NCBI网站上的BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)进行序列比对。通过DNAstar(Lasergene7.1)软件推导*tnp2*基因蛋白质的氨基酸序列，并使用DNAstar分析软件MegAlign Clustel W (Slow/ Accurate)对绵羊和其他哺乳动物的*tnp2*进行cDNA核苷酸序列的同源性比较。

1.7　RT-PCR检测体外培养的生殖细胞中*tnp2*基

因的转录表达

参照本实验室已建立的睾丸生殖细胞体外培养方法(Wu et al，2005；Zhang et al，2007)，取4月龄绵羊睾丸组织，进行体外共培养。取组织块及原代共培养期间2—10周的细胞，提取总RNA，以反转录得到的cDNA第一链为模板，以绵羊*gapdh*的编码cDNA为内部参照，根据本研究克隆的*tnp2* cDNA编码区序列设计一对引物，进行RT-PCR分析，引物如表1。同时取绵羊肝脏组织作为转录表达对照。

2　结　果

2.1　*tnp2*基因cDNA的克隆及重组质粒的筛选和鉴定

以蒙古绵羊成年睾丸组织总RNA为模板，经RT-PCR反应，得到一个约384 bp的片段(图1)，与预期的cDNA片段大小相符。胶回收RT-PCR反应扩增产物，回收产物与pMD19-T载体(2962 bp)连接，连接产物转化*E.coli* DH5α获得阳性克隆。提取质粒DNA，用PCR法筛选重组质粒，经限制性内切酶*Bam*HⅠ和*Hin*dⅢ双酶切鉴定。阳性重组质粒经DNA序列测定结果表明，插入片段长384 bp，经过序列比对，证明这个片段确实是绵羊的*tnp2*基因的cDNA序列。

表1　RT-PCR引物

Tab. 1　Oligonucleotides used for RT-PCR

目的基因 Target gene	引物序列 Sequence of primers	产物大小 (bp) Product size	退火温度 (℃) Annealing temperature
tnp2	P3：AAAGCCACGCCTGCAACCAGTG (Fw) P4：TGGTGGGAGTGCATGGTGTATCTGTG (Rv)	199	61
gapdh	P5：CATCACCATCTTCCAGGAGCGAG (Fw) P6：CACCCTGTTGCTGTAGCCGAAT (Rv)	754	58

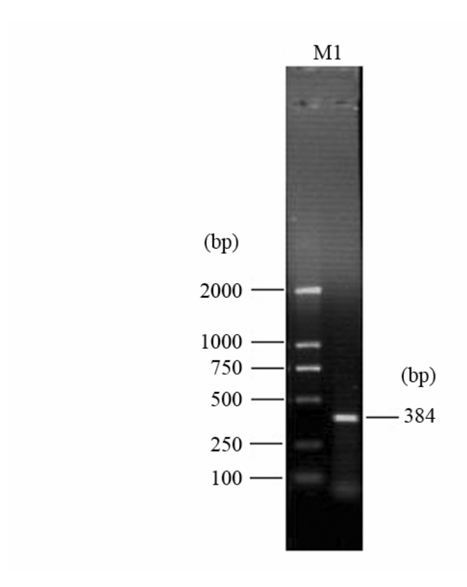


图1　*tnp2*基因RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1　The RT-PCR products of *tnp2* cDNA

M：DL2000 DNA 分子量标准; 1：RT-PCR 产物。

M:DL2000 DNA Marker; 1:The RT-PCR products of *tnp2* gene.

2.2　绵羊*tnp2*基因cDNA核苷酸序列分析及同源性比较

在其他物种cDNA已知序列的基础上，通过RT-PCR方法将绵羊*tnp2*的cDNA扩增，得到了384 bp的*tnp2* cDNA编码区核苷酸序列。其中克隆出的部分ORF长度为340 bp，编码113个氨基酸残基(图2)。通过同源性比较，绵羊*tnp2*基因cDNA核苷酸序列与牛(NM_174200)的同源性最高，达到95.3%。而与猪(X57989)、人(NM_005425)、黑猩猩(XM_001141940)、大鼠(NM_017057)和小鼠(NM_013694)的同源性分别为77.2%、67.4%、67.1%、66.7%和64.9%。

2.3　绵羊雄性生殖细胞体外共培养体系中圆形精子细胞形成的检测

用*gapdh*作为内部参照，对不同培养时间的绵羊睾丸生殖细胞样品进行*tnp2*基因的RT-PCR检测，得到了199 bp的PCR产物(图3)，与预期的片段大小相符。结果显示在4月龄及成年睾丸组织和体外共培养2—10周的生殖细胞中均检测到了*tnp2*基因的转录表达，但是在肝脏组织中没有检测到*tnp2*基因的转录表达(图3)。

3　讨　论

精子发生是从精原细胞分化为雄性配子的复杂的生物学过程。此过程主要由3个阶段组成：减数分裂前期阶段，二倍体精原细胞分化为二倍体初级精母细胞；减数分裂阶段，精母细胞经两次连续减数分裂转变为单倍体圆形精子细胞；精子形成阶

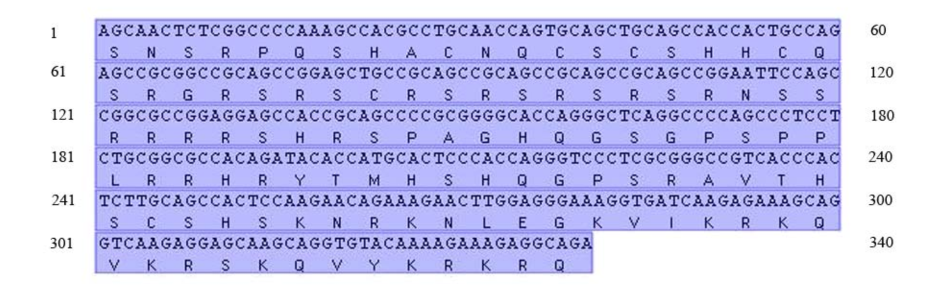


图 2 绵羊 *tnp2* cDNA 的核苷酸序列及 113 个氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequences of sheep *tnp2* gene cDNA and 113 amino acid

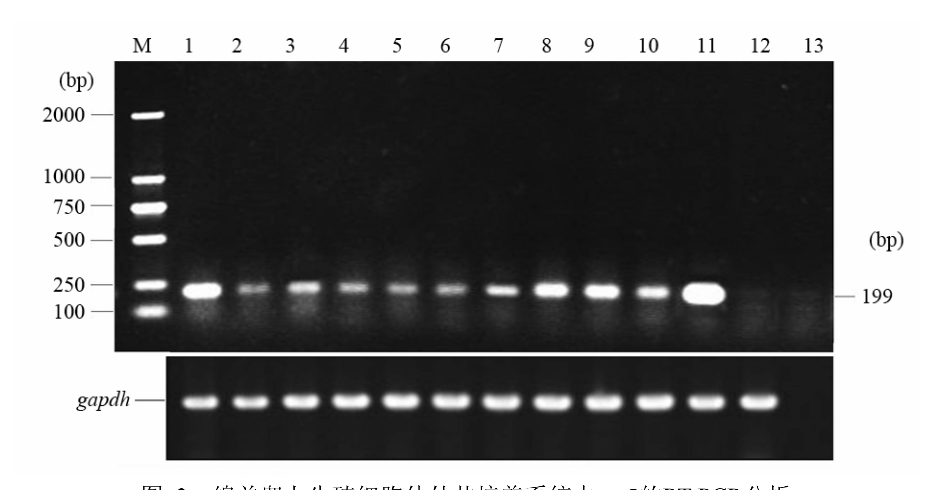


图 3 绵羊睾丸生殖细胞体外共培养系统中*tnp2*的RT-PCR分析

Fig. 3 The *tnp2* RT-PCR analysis of testicular germ cells of sheep co-cultured *in vitro*

M：DL2000 DNA 分子量标准; 1：4月龄绵羊睾丸组织；2—10：绵羊睾丸生殖细胞与Sertoli细胞体外共培养从第2至第10周的样品；11：成年绵羊睾丸组织；12：绵羊肝组织；13：水。

M: DL2000 DNA Marker; 1: Testis tissues of the 4-month sheep; 2−10: Sheep testis germ cells co-cultured with Sertoli cells *in vitro* from 2nd week to 10th week; 11: Testis tissues of the adult sheep; 12: The sheep liver tissues; 13: H_2O.

段，精子细胞分化为精子。在哺乳动物精子发生过程中配子核形态和组成均发生了改变，精原细胞和精母细胞的染色质蛋白像大多数体细胞一样主要由组蛋白组成。在减数分裂阶段，精原细胞和精母细胞的染色质中可检测到很多新的组蛋白变种。随后生殖细胞进一步分化进入精子形成阶段，许多组蛋白被过渡蛋白替换，然后顺序性的被鱼精蛋白替换，形成精子的核鱼精蛋白(Zhao et al，2004)。在这个过程中，染色质发生了转变，转录活性的核转变为精子中静止的核，这需要大量的DNA结合蛋白的瞬时表达调节。因此，对于精子发生过程中单倍体阶段调节基因表达的分子和分子机制的研究是非常吸引人的。*tnp2*基因是在雄性生殖细胞减数分裂后期表达的一个基因，在精子形成过程各种睾丸蛋白调控中，其转录和翻译的调节机制是具有代表性的。研究发现，在鼠类中*tnp2*基因的mRNA首先在圆形精子细胞中合成，以无翻译活性的mRNA核蛋白颗粒形式储存长达5—7天，直至在长型精子细胞中被激活指导翻译。过渡蛋白2(transition protein-2，TP2)是形成鱼精蛋白进而完成染色质凝聚所必需的(Meistrich et al，2003；Zhao et al，2004)。为了研究绵羊的精子细胞形成和变态过程，我们克隆了绵羊的*tnp2*基因。

Reinhart et al(1991)报告了牛的*tnp2*基因和氨基酸组成（NM_174200），目前绵羊*tnp2*基因序列尚未报道。本研究通过RT-PCR和分子克隆技术，成功克隆了*tnp2*基因的cDNA编码区片段，获得了绵羊*tnp2*基因的部分cDNA序列，为克隆全序列打下基础。对绵羊和其他哺乳动物的*tnp2*进行cDNA核苷酸序列的同源性比较发现，该扩增序列与牛的核苷酸序列具有95.3%的同源性。而与猪、人、黑猩猩、大鼠和小鼠比较也具有较高的同源性。说明*tnp2*基因在进化上具有一定的保守性，特别是在反刍动物中具有非常高的保守性。

目前，国内外学者相继在小鼠、大鼠和牛等动物上成功地建立了生殖细胞体外培养的方法，并利用体外共培养系统对精子发生过程中相关因子和基因进行了研究 (Lee et al，2001；Iwanami et al，2005；Huleihel et al，2007) 。本研究采用四月龄的绵羊睾丸进行体外共培养。通过RT-PCR法分析显示，此四月龄的睾丸组织已经存在圆形精子细胞（图3）。对4月龄的睾丸组织制备的共培养体系进行基因的转录表达分析，结果显示从2—10周一直有*tnp2*基因的转录表达，表明该共培养体系在体外长达十周的培养过程中一直存在着生殖细胞的分化及精子发生过程，不断地产生圆形精子细胞。这与我们对绵羊生殖细胞体外共培养系统中细胞形态的观察结果相一致（未发表资料）。这为我们利用该体系来进行绵羊精子发生过程中生殖细胞分化、减数分裂和圆形精子细胞形成过程的相关因子和基因的研究奠定了基础。

参考文献：

Griswold MD. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis[J]. *Biol Reprod*, **52**: 211-216.

Hecht NB. 1990. Regulation of “haploid expressed genes” in male germ cells[J]. *J Reprod Fertil*, **88**: 679-693.

Huleihel M, Abuelhija M, Lunenfeld E. 2007. *In vitro* culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations[J]. *Growth Factors*, **25**(4): 236-252.

Iwanami Y, Kobayashi T, Kato M, Hirabayashi M, Hochi S. 2005. Characteristics of rat round spermatids differentiated from spermatogonial cells during co-culture with Sertoli cells, assessed by flow cytometry, microinsemination and RT-PCR [J]. *Theriogenology*, **65**(2): 288-298.

Kierszenbaum AL. 1994. Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages[J]. *Endocr Rev*, **15**: 116-134.

Lee DR, Kaproth MT, Parks JE. 2001. *In vitro* production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls[J]. *Biology of Reproduction*, **65**: 873-878.

Marret C, Avallet O, Perrard-Sapori MH, Durand P.1998.Localization and quantitative expression of mRNAs encoding the testis-specific histone TH2B, the phosphoprotein p19, the transition proteins 1 and 2 during pubertal development and throughout the spermatogenic cycle of the rat [J]. *Mol Reprod Dev*, **51**: 22-35.

Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis[J]. *Chromosoma*, **111**: 483-488.

Parvinen M. 1982. Regulation of the seminiferous epithelium[J]. *Endocr Rev*, **3**: 404-417.

Reinhart N, Kremling H, Luerssen H, Adham IM, Engel W. 1991. Characterization of a gene encoding a basic protein of the spermatid nucleus, TNP2, and its close linkage to the protaminegenes in the bull[J]. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **372** (6): 431-436.

Skinner MK. 1991. Cell–cell interactions in the testis[J]. *Endocr Rev*, **12**: 45-77.

Wu YJ, Luo FH, Xue XX, Bou S. 2005. Long-term culture and spermatogenisis observation of germ cells from seminiferous tubules of Cashmere goat[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis NeiMongol*, **36**(4): 411-416.[吴应积, 罗奋华, 薛晓先, 旭日干. 2005. 绒山羊雄性生殖细胞的长期培养和分化观察. 内蒙古大学学报(自然科学版), **36**(4): 411-416.]

Zhang Y, Luo FH, WU YJ. 2007. Co-culture and spermatogenesis observation of germ cells from rat seminiferous tubules[J]. *Chinese Journal of Andrology*, **22**(12): 39-42.[张 岩, 罗奋华, 吴应积. 2007. 大鼠曲细精管生殖细胞体外共培养和精子发生过程的观察. 中国男科学杂志, **22**(12): 39-42.]

Zhao M, Shirley CR, Hayashi S,Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yaagimachi R, Meistrich ML. 2004. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation an functional sperm development[J]. *Genesis*, **38**: 200-213.